〔51〕 Yunis, J. J. and Chadler, M. E. 1978 Prg Clin. Pathol 7:267—288
〔52〕 Rohme, D. and Heneen, W. K. 1982 Premature Chromosome Condensation, Application in Basic, Clinical, and Mutation Research (Ed. P. N. Rao, R. T. Johnson, K. Sperling) pp: 131—153
〔53〕 Зыбина, Е. В. 1977 Цитология XIX:327—336

鸟类染色体组型及斑带技术

四川大学生物系细胞研究室

鸟类染色体数目较多，其中小染色体又难于计数，研究鸟类染色体的作者较少。据HäKan tegel'ström和HansRyttman（1981）报道，在8700种鸟类中作过核型研究的只有302种，仅占鸟类总数的3.5%。近些年来国外一些作者把染色体分带技术用于鸟类染色体的研究，使鸟类染色体的研究有了进一步的发展。但是鸟类染色体的研究在国内还较少，一般仅停留在染色体组型的研究，关于鸟类染色体分带染色的研究迄今尚未见报道。本文主要介绍我们汇集的有关鸟类染色体制备、组型分析、分带染色等资料，以及我们在试验中常用的一些方法，以促使我国这方面工作的开展。

一、鸟类细胞的培养

（一）外周血培养〔1、8、9、20、40〕

（1）培养基组成：RPMI1640（或199，Ham's F_{10}）4毫升，鸡血清或小牛血清1毫升，PHA0.05毫升（雪山大豆制），肝素（500国际单位/毫升）0.03毫升，青、链霉素（各1万单位/毫升）0.03毫升，200mML—谷氨仙胺0.1毫升，一并加入25毫升的培养瓶内，以5%$NaHCO_3$调至pH7.0—7.2。

（2）采血：从心脏或翼下静脉采血5毫升，连同0.1毫升PHA置离心管中，冰箱静置30分钟或以200—400转/分离心5分钟，在无菌条件下用吸管轻轻搅动上层。使成为含白细胞较多的红白血球细胞混悬液。

（3）接种：每瓶接种1毫升细胞悬液。

（4）培养：置39°C恒温箱中培养72小时，在收获细胞前1—2小时加秋水仙胺或秋水仙素，最终浓度为秋水仙素0.04—0.8微克/毫升生长液（秋水仙胺为0.002—0.08微克/毫升生长液）。按常规空气干燥法制片。

鸟类红血细胞含量较多，如果不把红、白血球分离后再培养，培养过程中易溶血，影响细胞生长。此外，鸟类细胞培养最好用鸡血清。

（二）组织培养[4、6、13、25、26、28、41]

（1）单层细胞培养法

1）取孵化10天左右的鸟胚的皮肤和肌肉，或幼鸟前胸肌肉，放入小套碟中，在D—Hank's液内，剪成$1mm^3$的小块；

2）用D—Hank's液（pH7.0）洗涤2次（每次10毫升），直到溶液清亮为止；

3）加10毫升D—Hank's液于组织小块内，用吸管将组织块移入装有磁棒（或硅树脂磁石）的三角瓶内，去掉D—Hank's液；

4）加入10毫升0.25%胰酶溶液（胰蛋白酶用含有0.02%EDTA的D—Hank's液配制，预热至37°C），轻轻摇动三角瓶，组织块聚集成絮状；

5）放入37°C水浴，消化15—20分钟，倒掉胰酶上清液，另加新预温的0.25%胰酶溶液，每5分钟轻轻摇一次，消化好的组织块已形成的絮状又散开；

6）倾去胰酶溶液，用D—Hank's液洗三次（每次10毫升），以除去胰酶和死亡的组织及细胞；

7）倒掉D—Hank's液，加10毫升含小牛血清的培养液将三角瓶放于电磁搅拌器上，使已被胰酶作用而变得疏松的组织块逐渐分散为单个细胞，如细胞分散不好，可反复4）、5）步骤，直到余下只纤维物质为止；

8）以1000转/分离心8分钟，去上清液；

9）将细胞悬浮于生长培养液中；

10）计数：

将上述细胞悬液分出1毫升，加4毫升生长培养液，即进行5倍稀释，用吸管滴一滴细胞悬液在血球计数室内，稍静止后，让细胞下沉，在低倍镜下数四角四个大方格（每个大方格具16个小方格）的细胞数，然后按下式进行计算。

设n＝四个大方格内的细胞总数，则

$$每毫升原悬浮液的细胞数=\frac{n}{4}\times 10000\times 5$$

11）分装细胞和培养

计数后可得每毫升含细胞量多少，然后按所需加入生长液稀释至每毫升生长液含50—60万细胞，然后分装到各培养瓶。每个培养瓶加：

RPMI—1640（或Eagle's；McCoy's 5a） 4毫升

小牛血清 1毫升

Hepes 配制成1.2%溶液，用1N NaOH调至pH7.0—7.2，每5毫升培养液加0.15毫升，最终浓度为$2\times10^{-2}M$，青链霉素各100单位/毫升 用5%$NaHCO_3$（灭菌）调pH6.8—7.2，将培养瓶移入39°C温箱内培养。

12）培养24小时后，即可观察细胞生长情况。一般2—3天后即可传代或用此制备染色体。

（2）组织块培养法

1）取孵化10天左右的鸟胚的皮肤或肌肉，或幼鸟前胸肌肉，放入小套碟中，用D

—Hank's液洗2次；

2）用眼科剪反复剪成0.5—1立方毫米的组织块；

3）向小套碟内加2—3毫升培养液，用吸管轻轻吹打，使组织块在培养液中翻动片刻后，再用吸管把1立方毫米左右组织块和细小碎块悬液（内含有细胞团）分开，分别置于瓶中备用；

4）用一毫升注射器，5号针头，滴一滴鸡血浆于小方瓶高的一面，用弯头吸管涂满整个瓶壁；

5）用吸管吸一些组织块到培养瓶中，用弯头吸管把小块在瓶壁上摆匀，再在组织块上加1滴鸡胚浸出液，翻转培养瓶，加足5毫升生长液，塞紧瓶口；

6）置于39°C温箱中2—4小时，待组织块牢固贴于瓶壁后。再轻轻翻转培养瓶，让组织小块浸泡在生长培养液里静止培养；

7）生长液的配制和观察细胞同"单层细胞培养法"。

二、鸟类染色体的制备方法

（一）外周血淋巴细胞染色体的制备[1、8、9、20、40]

经39°C培养72小时的外周血细胞，加入秋水仙素（Colchicine）或秋水仙胺（Colcemid），最终浓度为秋水仙素0.04—0.8微克/毫升生长液（秋水仙胺为0.002～0.08微克/毫升生长液），1—2小时以后收获细胞，细胞用0.075*M* KCl（在39°C水浴中）低渗15分钟，甲醇：冰醋酸（3：1）固定，换2—3次，最好盖上反口橡皮塞置冰箱过夜后滴片，按常规空气干燥法制片，10%Giemsa磷酸缓冲液染色（pH6.8）20—30分钟，空气干燥，镜检。

（二）组织培养细胞染色体的制备[4、6、13、25、26、28、41]

（1）处于对数生长期的细胞，加入秋水仙素或秋水仙胺，最终浓度与外周血相同。继续置39°C温箱培养。

（2）1—2小时后，从温箱取出培养瓶，左右反复摇动，使生长液在培养细胞表面反复冲刷，这样90%的分裂细胞可从瓶壁脱落，或用吸管吹打亦可，但勿用力过猛，以防混入多量非分裂细胞影响观察；或倾去培养瓶中原有的培养液，用D—Hank's液洗一次以后，加0.02%EDTA2Na溶液，25毫升方瓶（11.44平方厘米培养面）加0.2～0.5毫升，39°C消化2—4分钟，看到瓶壁细胞层上露出肉眼可见小孔时，用手摇动培养瓶，细胞脱离瓶壁消化下来，这时加入D—Hank's液3毫升，用吸管进行冲打进一步分散细胞。

（3）将细胞转入离心管中，1000转/分离心8分钟。

（4）低渗处理：吸除上清液，加入预温到39°C的0.075*M* KCl溶液（或3：1的水：生长培养液）7毫升，在水浴中（39°C）静置20—30分钟。

（5）预固定：向悬液中加入新鲜固定液（甲醇：冰醋酸3：1）1毫升，用吸管吹打调匀，这样可先使细胞表面轻微固定，能防止固定后细胞粘连成块。

（6）以1000转/分离心8分钟，吸除上清液，加新鲜固定液5—10毫升，轻轻吹

打均匀静置15—20分钟、反复固定2—3次，每次15—20分钟，按常规空气干燥法制片、染色、镜检。

（三）骨髓细胞染色体的制备[5、7、17、23、33、39、40]

（1）在取材前1—2小时经腹腔注入秋水仙素（剂量为2—4微克/克体重）。

（2）杀死动物，取出后肢胫骨和股骨。

（3）用剪刀剪去胫骨和股骨两端，用1毫升注射器吸0.6—1毫升2%柠檬酸钠溶液通过5号针头注入骨髓腔，反复冲洗，尽量将骨髓细胞冲入青霉素瓶中，剪下的端骨如有骨髓可放入少量2%柠檬酸钠用钳子压出细胞，一并收集到离心管内。

（4）将骨髓细胞转入10毫升离心管后，视骨髓细胞之多寡加入0.075*M* KCl 6—7毫升，随即将离心管置入39°C水浴中低渗20—30分钟。

其余步骤同"组织培养细胞染色体的制备"（5）、（6）步骤。

（四）羽髓细胞染色体的制备[35、40]

（1）方法Ⅰ：

1）给孵化17天以后的小鸟胚胎或初生雏鸟腹腔注射秋水仙素10—20微克/只，或将浓度为1微克/毫升的秋水仙胺1/40毫升到1/20毫升注射到羽毛基部软鞘部位。

2）1—2小时后拔取初级飞羽4—5根，以弯头镊子挤出羽髓置于表皿中。

3）加入0.2毫升0.02%EDTA2Na溶液，消化10—20分钟。

4）用吸管除尽EDTA2Na，然后加入2—3毫升D—Hank's液，用吸管反复吸打，使细胞分散。

5）以1000转/分离心10分钟，弃上清液，加3—4毫升0.075*M* KCl（或0.45%柠檬酸钠），39°C低渗15分钟，然后固定、制片、染色同骨髓法。

（2）方法Ⅱ：

1）从快满期出壳的小鸟或小鸟拔取初级飞羽4—5根。2）用弯头镊子挤出羽髓置于表皿中，加0.2毫升0.02%EDTA2Na，消化10—20分钟。3）然后吸取含小牛血清的生长培养液3—4毫升，39°C培养4小时后加秋水仙素（或秋水仙胺），最终浓度同外周血，继续培养2小时，取出按常规方法制片。

（五）胚胎细胞染色体的制备[40、42]

（1）方法Ⅰ：

给孵化16—18天的鸟胚胎中注射秋水仙素10—20微克/只，2—3小时后取胚胎的内脏组织（脾、肾、肝等），分别置于表皿中，剪成碎块。各加0.2毫升0.02%EDTA2Na溶液，在20—25°C下消化15—20分钟，然后加入少量0.75%NaCl，用1毫升注射器（不连针头）反复吸打，使成细胞悬液，移入离心管中，1000转/分离心10分钟。加0.45%柠檬酸钠（或0.4%KCl）低渗15—20分钟（39°C），以下步骤同骨髓法。

（2）方法Ⅱ：

1）将孵化2—3天的胚胎取出放入含有20%小牛血清及0.001%秋水仙素的1640培养液（或Eagle's液）中，39°C温育1—2小时。

2）将温育后的胚胎放入39°C 0.45%柠檬酸钠中，低渗处理10—15分钟。

3）低渗后的胚胎用3：1甲醇：冰醋酸固定，固定时间至少2—3小时，也可以

在冰箱（4℃）中过夜。

4）制片时，可将固定后的单个鸟胚，放在干净载片上，快干前，加一滴3：1的冰醋酸：50%乳酸，在解剖镜下见到细胞开始分散时，加3：1的甲醇：冰醋酸，然后进行空气干燥，如果细胞及染色体分散得不够理想，则可以在冰醋酸和50%乳酸（3：1）及甲醇：冰醋酸（3：1）的步骤之间用9：3：4的甲醇：冰醋酸：蒸馏水处理胚胎。

5）空气干燥的染色体制片，用Giemsa染色、观察。

注意：

①低渗时间是关键。一般发育阶段较早的，低渗的时间可以略短，而囊胚阶段，处理时间则需12—15分钟。

②用冰醋酸：50%乳酸（3：1）分离固定过的胚胎时，每一滴液体尽量不超过2 *mm*直径，因为量太多或处理过久都会使中期板发生破碎、染色体丢失太多，影响实验效果。

鸟胚甚小，当放入甲醇：冰醋酸（3：1）固定液时，易随液体流动而难以观察，又极易丢失，因此低渗后，最好放入装有甲醇：冰醋酸（3：1）的小型培养皿（35—40mm×10mm）的底部，这样对观察和吸取都方便。

三、鸟类体细胞染色体组型分析[8、14、15、27、39]

鸟类的标准核型为2n＝80，核型中有8对大型染色体（macrochromosomes）和32对微小染色体（microchromosomes）不少作者的工作表明，微小染色体和大型染色体在结构、性质和遗传行为上没有本质不同，在鸟类核型进化中有微小染色体数目减少而大型染色体增多的趋势。性染色体为ZZ♂/ZW♀。

按空气干燥制备的染色体标本，用Giemsa染色，镜检，选择50个中期细胞拍照，在放大机或底片阅读器上计数得出二倍体染色体数目。再选用10个优质的中期分裂相进行染色体测量，算出相对长度、臂指数和臂数。

（一）相对长度（Relative length）：

指单个染色体的长度与包括Z染色体在内的单倍体染色体总长之比，以百分率表示，即

$$相对长度=\frac{单条染色体长度}{单倍常染色体+Z染色体的总长}\times 100$$

（二）臂指数（Arm index）：

指长臂同短臂的比率。即

$$臂指数=\frac{长臂的长度}{短臂的长度}$$

染色体的形态按Levan的标准划分：臂比指数在1.0—1.7之间称为中部着丝粒染色体（m）；在1.7—3.0之间称为亚中部着丝粒染色体（sm）；在3.0—7.0之间称为亚端部着丝粒染色体（st）；指数＞7.0者称为端部着丝粒染色体（t）

（三）染色体臂数（NF）：

是根据着丝粒的位置来确定的，着丝粒位于染色体端部，称端部着丝粒染色体，其臂数计为一个；若着丝粒位于染色体中部或亚中部，那么，染色体臂数计为二个。

核型是按照染色体的大小，着丝粒的位置顺序编号（包括性染色体在内）并分组排队。

分析鸟类核型比较困难是由于：①微小染色体和大型染色体之间无严格的界限，从微小染色体区分出大型染色体有一定人为因素。②最小的微小染色体在油镜下不易计数。③在制片时微小染色体易丢失。④微小染色体容易藏在大染色体下面不易识别出来。⑤微小染色体之间互相靠陇而难于识别。⑥易将染色的斑点或染料颗粒误认为是微小染色体。最好是将中期相拍成底片（用电影录音底片），在放大机、底片阅读机或显微投影仪下计数，以便更为可靠。

四、鸟类染色体斑带技术

（一）Q—带[1、6]

新制备的鸟类染色体标本在37°C恒温箱内处理12—18小时左右。

（1）QM萤光染色法

1）浸入McIlvaine缓冲液（0.1*M*柠檬酸溶液4.55毫升，0.2*M*磷酸氢二钠溶液15.43毫升，pH6.8）中几秒钟。

2）在50微克/毫升芥子喹吖咽（QM，用0.1*M* McIlvaine缓冲液配制，pH6.8）中20°C染色18—20分钟（蔽光）。

3）用McIlvaine缓冲液分色三次，每次2分钟（蔽光）

4）以上述缓冲液封片。

5）置萤光显微镜下观察。

6）彩色摄影。

（2）吖啶橙萤光染色法

1）在0.1M磷酸缓冲液（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$28.8克，$KH_2PO_4$2.67克溶于1000毫升三蒸水中，pH6.8）中，85°C处理8分钟。

2）然后用0.01%吖啶橙染液（简称AO，用0.1*M* McIlvaine缓冲液配制）染色6分钟。

3）在McIlvaine缓冲液中漂洗两次，每次各2分钟。

4）AO染色的细胞用Kodachrome 64彩色胶卷摄影。

（二）G—带[1、13、19、25、37]

（1）修改Wang和Fedoroff（1972）等人的方法

1）空气干燥的染色体制片，在37°C温箱内预处理3—24小时。

2）标本在0.25%胰蛋白酶溶液〔25mg胰蛋白酶（Difco），50毫升GKN溶液（1克葡萄糖，0.4克KCl，8克NaCl，0.35克$NaHCO_3$，加蒸馏水至1000毫升，用NaOH调至pH7.5—7.8），50毫升Versene溶液（8克NaCl，0.2克KH_2PO_4，0.2克KCl，1.55

克$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$或3.1克$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，加蒸馏水至1000毫升)〕内处理30—50秒。

3）在GKN溶液内漂洗30秒。

4）用2%Giemsa磷酸缓冲液（pH6.8）染色5—10分钟。

5）自来水细流冲洗数秒，空气干燥，镜检。

（2）修改Seabright（1971）方法[28、36、43]

1）0.25%胰酶溶液（生理盐水配制）处理30—60秒。

2）生理盐水漂洗数秒。

3）用95%乙醇冲洗，并使其干燥。

4）用2%Giemsa磷酸缓冲液（pH6.8）染色10—15分钟。

5）空气干燥、镜检。

（3）Yosida等人尿素法（1972）[28、29、30、43]

1）配制尿素溶液：3份8*M*尿素溶液与1份Sörensen's磷酸缓冲液（0.15*M*，pH6.8）混合加热到37°C（存放时间长的玻片，温度可提高到60°C）。

2）将玻片在37°C尿素溶液中30秒—10分钟。

3）自来水细流冲洗，不等片子干燥就直接染色。

4）用2%Giemsa磷酸缓冲液（pH6.8）染色10—15分钟。

5）自来水细流冲洗，空气干燥，镜检。

（三）C—带

（1）Sumner A·T（1972）方法[1、3、13、23、25、31]

1）染色体标本在0.2*N*盐酸溶液中室温处理1小时。

2）蒸馏水漂洗数秒。

3）将标本浸于50°C的5%$Ba(OH)_2$水溶液中处理4—6分钟（注意密闭）。

4）用预热至60°C的蒸馏水洗数秒。

5）在60°C 2×SSC溶液中处理1小时。

6）蒸馏水洗数秒。

7）10%Giemsa磷酸缓冲液染色30—40分钟。

8）自来水细流冲洗数秒，空气干燥，镜检。

（2）Arrighi和Hsu的修改方法（1974）[17、43]

按常规方法制备的染色体标本，以下列步骤处理：

1）70%乙醇（二次），95%乙醇（二次），每次各5分钟，空气干燥。

2）在2×SSCNaOH（pH12）溶液中处理18—25秒（20—25°C）或在5%$Ba(OH)_2$溶液中，50°C处理1—2分钟。

3）70%乙醇（二次），95%乙醇（二次），每次各5分钟，空气干燥。

4）在直径为16cm的培养皿内安放玻璃棒烧成的支架，培养皿底部加入10—15毫升6×SSC溶液，使整个培养皿被6×SSC蒸气饱和，将经上述程序处理的玻片标本，细胞面向上，加1滴6×SSC溶液，盖上盖片，平放于玻璃支架上，使玻片不接触培养皿底部的6×SSC溶液盖上培养皿盖子，65°C温箱孵育20—24小时。

5）将染色体玻片标本从温箱中取出，轻轻抖动使盖片滑掉，如贴附很紧，可连盖

片一起进入70%乙醇脱水，盖片会自然松开，切不可硬将盖片拉开，不然会使大量染色体受到损伤。

6）在70%乙醇（二次），95%乙醇（三次），每次各5分钟，空气干燥。

7）用Giemsa染液染色1小时。

①柠檬酸—磷酸盐缓冲液：用0.1*M*柠檬酸溶液将0.2*M* Na_2HPO_4溶液调整至pH 7.0。

②Giemsa染液：50毫升蒸馏水内，加1.5毫升柠檬酸—磷酸缓冲液和1.5毫升纯甲醇（A、R），5毫升Giemsa原液。

我们在应用此方法时省略了HCl一步。两种方法均能很好的显示鸟类染色体C一带。

（四）R—带[1、4、6、10]

采用Dutrillaux et al（1973）方法，简称RBA技术。

（1）培养的细胞，在加秋水仙素7小时前加BUdR，最终浓度为300微克/毫升生长液。

（2）在收获细胞前3—4小时加秋水仙素。最终浓度为0.04—0.8微克/毫升生长液。

（3）按常规空气干燥法制片，可用两种方法处理：

a、吖啶橙染色：

1）用吖啶橙（AO3.5mg/70毫升1/15*M*磷酸缓冲液，pH6.7）染色4—5分钟。

2）在1/15M磷酸缓冲液中漂洗两次。

3）用同样的磷酸缓冲液封片，萤光显微镜观察。

b、萤光—Giemsa染色法：

1）所制标本在Hoechst 33258工作液（5微克/毫升生理盐水）中染色20分钟或在吖啶橙工作液中（1毫克/毫升，配制方法同上法）染色5分钟。

2）用磷酸缓冲液漂洗2次。

3）在恒温水浴内放一铝饭盒，内放一铁丝架（或玻璃架）内加磷酸盐缓冲液（45°C），溶液的高度以不超过铁丝架为准（最好接近）。在染色体制片上滴加较多磷酸缓冲液，盖一小张擦镜纸，将紫外线灯（带罩）放在恒温水浴上，灯与标本垂直，照射15—20分钟，照射距离6厘米。

4）蒸馏水冲洗二次。

5）在欧氏液（溶液A：NaCl 6.80克，KCl 0.40克，$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.14克，溶解在800毫升蒸馏水中；溶液B：$CaCl_2$（无水）0.20克，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.17克，溶解在200毫升蒸馏水中；工作液，溶液A：800毫升，溶液B：900毫升 pH6.5）中，86°C处理1—2分钟。

6）蒸馏水洗二次

7）10%Giemsa磷酸缓冲液染色5—10分钟，自来水细流冲洗，空气干燥，镜检。

注意：

①紫外线照射时间越长，在欧氏液中处理时间就越短。

②标本宜新鲜为好，隔夜即可用。

（五）高分辨染色体[27、38]

胚胎成纤维细胞（传代2—3次），按Yunis et al.（1978）稍作修改的氨甲蝶呤（amethopterin）同步化的方法。

（1）处于对数生长期的细胞用$10^{-7}M$氨甲蝶呤(methotrexate) 37°C处理17小时。

（2）用预温至37°C的1640培养液（或其它培养液）洗两次。

（3）然后把细胞接种在含10^{-5}胸腺嘧啶核苷的综合培养液里，37°C继续培养5.5小时。

（4）去培养液，加含有0.05微克/毫升秋水仙胺（Colcemid）的0.25%胰蛋白酶溶液3—4毫升，37°C处理10分钟。

（5）去胰蛋白酶溶液，加6—7毫升0.075M KCl溶液，37°C处理10分钟。

（6）用手水平方向摇培养瓶15—16次，加1毫升新配制的固定液（甲醇：冰醋酸 3：1），吸管打匀，转入尖底离心管。

（7）以1000转/分离心10分钟，去上清液。

（8）沿管壁缓缓加入新配制的固定液，立即打匀，如此反复固定2—3次。

（9）按常规空气干燥法制片。

（10）染色。

1）片龄为1—2周的染色体标本（室温保存）用0.1%胰蛋白酶处理5—10秒。

2）用70%乙醇浸洗数秒。

3）用2%Giemsa磷酸缓冲液（pH6.8）染色4—5分钟。

选择伸展和带形好的前中期和早中期分裂相摄影，作带型分析。

（六）N—带[12、22、23、26]

用这种方法可将鸟类染色体核仁组织者区（NORs）染得很深，而染色体的其它部分则是淡染，因为这种方法只对核仁组织者区染色，Hatsui和sasaki称这个方法为N—带，他们认为N—带乃是某种结构上的非组蛋白性的蛋白质和核仁组织者专特性结合的地方。

空气干燥的染色体制片按以下步骤处理：

（1）染色体制片在80—90°C 5%三氯醋酸（TCA）溶液中处理30分钟，自来水细流冲洗。

（2）再在60°C 0.1N HCl中孵育30—44分钟，自来水细流冲洗。

（3）用1%Giemsa磷酸缓冲液（pH7.0）染色60分钟。

（4）镜检。

（七）NOR染色[1、3、16、26]

银染色的是有转录活性的NOR，一般NOR位于次缢痕的位置。多数鸟类Ag—NORs定位于微小染色体上。

我们采用Goodpasture等人（1976）Ag—I染色，此方法重复好，质量较佳。

操作方法：

（1）玻片标本平放在培养皿内玻璃架上，细胞面向上，培养皿底部放一被蒸馏水润湿的滤纸。

（2）每张玻片标本加4滴50%$AgNO_3$溶液，盖上盖片，盖严培养皿。

（3）放入65°C温箱孵育8—12小时，最好过夜。

（4）从温箱取出培养皿，用自来水细流冲掉玻片标本上的盖片，空气干燥后分别按以下几种情况处理：

1）经65°C孵育后的染色体已呈现金黄色，已可见核仁组织者，就不再染色而直接显微摄影。

2）可见核仁组织者，但颜色不够深，可用2%Giemsa磷酸缓冲液（pH6.8）染色1—3分钟。

原方法是在培养皿底部加少量蒸馏水造成湿润小室，我们根据昆明动物研究所经验，改用滤纸浸湿蒸馏水造成湿润小室，另将温度由40°C增加至65°C。根据我们体会用隔夜配制的50%$AgNO_3$溶液和"片龄"为一天的标本效果更好些。

（八）复制带[1、10]

采用修改Dutrillaux et al.（1973）方法的RBA—染色法。具体步骤参见R—带中吖啶橙染色法一段。用此方法证明，雄性两个ZZ染色体显示同步复制，而雌性W染色体迟复制。

参考文献

[1] Biederman. B. M et al. 1980 *Cytogenet. Cell Genet* 28:79—86

[2] Bull 1978 *Can. J. Genet Cytol* 20:205—209

[3] Bloom S. E and Goodpasture C 1976 *Hum Genet* 34:199—206

[4] Christer Carlenius et al. 1981 *Hereditas* 94:61—66

[5] Capnna. B. et al. 1982 *Cyto. Cell Genet* 34:35—42

[6] Coming. D. E. and Wyundt. H. E 1976 *Exp. Cell Res* 99(1):183—185

[7] Calafati and Capanne 1981 *Avocetta* 5:1—9

[8] De Boer L. E. M and Van Brink J. M. 1982 *Cyto. Cell Genet* 34:19—34

[9] De Boev L. E. M. 1976 *Genetica* 46:77—113

[10] Dutrillaux et al. 1973 *Compt. Rend. Acad. Sci* (paris) Ser. D. 276:3179—3181

[11] Donneliy G. M. et al. 1963 *Expl. Cell Res* 30:363—368

[12] Funsk. K. et al. 1975 *Chromosoma* (Berl) 49:357—370

[13] Hams Ryttman et al. 1979 *Hereditas* 91:143—148

[14] Hakan iegelström et al. 1981 *Hereditas* 94:225—233

[15] Hammar. B. 1970 *Hereditas* 65:29—58

[16] Kodama. Y et al. 1980 *Jan. J. Human Genets* 25:229—233

[17] Katherine stefos et al. 1971 *Expl Cell Res* 68:228—231

[18] Levan. et al. 1964 *Hereditas* 52:201—220

[19] Lima. A-De-Faria 1980 *Hereditas* 92 (2):267—273

[20] Lin et al. 1976 *Can. J anim Sci* 56:27—31

[21] Lin et al. 1978 *Manual* 4:937—940

[22] Matsni S. I. M and SaSaki 1973 *Natuve* 246:148—150

[23] Raman R et al. 1978 *Genetica* 48 (1):61—65

[24] Rasch. E. M etal 1979 *Cyto Cell Genet* 24:129—139

[25] Stock. A. D and Bunch. T. D. 1982 *Cyto. Cell Genet* 34:136—148

〔26〕 Sasaki. M et al. 1981 *Chromosome Information Service* 30:25—27
〔27〕 Sasaki. M. 1981 *Chromosome Information Service* 31:26—28
〔28〕 Stock. A. D et al. 1974 *Cyto. Cell Genet* 73:410—418
〔29〕 Shiraisghi and Yosida 1972 *Chromesoma* (Berl) 36:204—210
〔30〕 Shiraisghi and Yosida 1972 *Chromesoma* (Berl) 36:75—83
〔31〕 Sumner A. T. 1972 *Expl. Cell Res* 75:304—306
〔32〕 Stefos and Arrighi 1971 *Expl. Cell Res* 68:228—231
〔33〕 Sharma and Raman 1972 *Cytogenetics* 11:247—258
〔34〕 Schmid. W. 1962 *Cytogenetics* 1:344—352
〔35〕 Shffner. R. N et al. 1967 *Poultry Sci* 46:333—344
〔36〕 Schwarzacher. H. G. and Walf. Veds (1974) "Methods in Human Cytogenetics" Springer. Verlag (四), 3(2)
〔37〕 Wang and Federoff 1972 *Nature new Biol* 235:52—54
〔38〕 Yunis. J. J. Science 191:1268—1270
〔39〕 王应祥等 1983 遗传 2(1):21—23
〔40〕 程光潮 1981 遗传 3(1):17—19
〔41〕 鄂征主编 "组织培养技术" 1982; 人民卫生出版社 P. 109—114
〔42〕 刘耀青等 1981 遗传 3(5):31—32
〔43〕 杨尼斯 (Jorge J. Yunis) 编著, 山东师范学院生物系译"人类染色体方法学" 科技资料(2) 1980, P.33

两栖类染色体组型及斑带技术

四川大学生物系细胞研究室

有关无尾两栖类染色体组型的研究，国外已有不少报道 (Benirschke et al, 1973; Bogart, 1968; Guillemnin, 1967; Haertel, 1974; Schmid, 1978a, 1978b)，近年来，国内亦有一些报道（吴政安，1978，1981；吴政安等，1980，李树深等，1981；陈文元等，1983）。近年来国外又开展了两栖类染色体分带技术的研究 (Schmid, 1978a、b, 1979, 1981; Beck和Mahan, 1979; Ruiz, et al, 1981; Vitelli, 1982)。在国内尚属初始阶段（李树深等，1982；吴政安，1983；杨玉华，1983；王子淑等，1983；温昌祥等，1983；邓崇新等，1983；尚克刚等，1982、1983)。

据现有的资料，两栖类的G—带尚未见报道，一般开展了C—带、NOR染色、SCD、SCE、R—带、复制带的研究工作，为了促进这方面工作的开展，现将我室常用于两栖类染色体研究的一些方法介绍于后，供交流参考。